

REVISTA DE LA FACULTAD DE MEDICINA

VOLUMEN 32

ABRIL - JUNIO DE 1964

2

DETERMINACION INMUNOLOGICA DE GONADOTROPINA CORIONICA

(Como método para diagnóstico de embarazo)

Por

ALBA SOFÍA SÁNCHEZ C. *

y

LUIS FELIPE FAJARDO L. G. **

Son varios los métodos clínicos que se han desarrollado para demostrar Gonadotropina Coriónica. Dichos métodos se basan tradicionalmente en la acción biológica de la hormona producida por las vellosidades coriales.

De estos métodos los más conocidos son los que utilizan ratas (Aschein-Zondeck), conejas (Friedman), batracios hembras tales como *Xenopus laevis* y batracios machos tales como *Bufo* sp. (Galli Mainini) y *Rana pipiens*.

En los últimos años se han desarrollado pruebas serológicas para la determinación de la Hormona Gonadotropina Coriónica. Brody y Carlstrom produjeron y demostraron *in vitro* una antigenadotropina coriónica humana

por medio de la fijación del complemento y de pruebas de precipitina (1).

Bussard y Grabar, Leathen, Rao, Shahani, etc., demostraron que la Gonadotropina Coriónica puede estimular la producción de anticuerpos específicos. Basados en estas observaciones, Wide y Genzell, Swiercinska, Samochowi, Carstron (2), etc., introdujeron el uso de partículas de látex para diagnóstico inmunológico del embarazo.

De acuerdo con investigaciones de la Fundación Ortho (3), la prueba in-

* Técnica de Laboratorio, Hospital Militar-Centro Médico, Bogotá.

** Jefe del Departamento de Laboratorios, Hospital Militar-Centro Médico, Bogotá.

munológica humana es sensible aproximadamente 20 U. I. de Gonadotropina Coriónica por ml. de orina; asumiendo una eliminación promedio diaria de 1.000 ml. de orina, esto es, equivalente a 20.000 U. I. por 24 horas. Aunque el primer espécimen de la mañana representa 8 horas de excreción concentrada en 200 ml., un nivel de 12.000 U. I. por 24 horas es necesario para producir una reacción positiva (4).

El antígeno usado contiene partículas de 0.81 de diámetro de poliestireno látex, sensibilizado con gonadotropina coriónica pura que ha sido "standarizado" a fin de que 0.5 ml. de Gonadotropina Coriónica aglutinen 1 ml. de antígeno en las condiciones usuales de la prueba.

Las partículas quedan libres en el caso de una reacción positiva o son aglutinadas en el caso de una reacción negativa.

Los autores encontraron este método bastante interesante y decidieron hacer un estudio comparativo de esta reacción inmunológica con la de Galli Mainini, para conocer su exactitud y sus ventajas; dicho estudio pudo llevarse a cabo gracias a la gentileza de los productores comerciales de los reactivos. *

MATERIAL

Se estudiaron 100 pacientes mujeres, repartidas así: 76 del Hospital Militar-Centro Médico; 14 del Instituto Materno Infantil, y 10 del Hospital de San Juan de Dios. En casi todas se sospechaba embarazo, y en cada una se practicó una prueba inmunológica y una reacción de Galli Mainini en suero y orina, para lo cual se le tomó a cada paciente una muestra de sangre y una de orina (la primera de la mañana).

METODOS

Reacción de Galli Mainini en orina.

Se utilizó el sapo bufo macho (*Bufo americano*) obtenido comercialmente en la región de Armenia (Caldas).

Se inyectaron 10 ml. de la orina de la presunta grávida en uno de los sacos linfáticos laterales. Después de un lapso que varió de una y media a cuatro horas, se obtuvo orina del sapo mediante la introducción de una pipeta en la cloaca. Se colocó una gota de la orina obtenida sobre un porta-objeto.

Se examinó directamente al microscopio con escasa iluminación. Si se comprobó la presencia de espermatoides se consideró la prueba positiva (5).

Reacción de Galli Mainini en suero.

Se utilizaron machos de *Bufo americano* con un peso aproximado, promedio de 150 grms., a los cuales se inyectaron 2 ml. de suero de la paciente en el saco linfático lateral; las lecturas se hicieron a partir de la primera hora. La obtención de las muestras de orina del contenido cloacal se hizo por micción espontánea del sapo en una lámina. Se examinaron al microscopio y se interpretaron lo mismo que la reacción en orina.

Reacción inmunológica.

Fundamento.

El suero Anti-Gonadotropina Coriónica Humana (que en adelante llamaremos Anti-GC), que contiene anticuerpos contra la Gonadotropina Coriónica Humana (que en adelante llamaremos GC), es incubado con la

* Ortho Pharmaceutical Co., Raritan, N. J., Estados Unidos.

orina de la paciente. Como la orina de la mujer embarazada contiene GC, dicho espécimen neutraliza los anticuerpos Anti-GC.

En la segunda etapa del examen se agregan partículas de látex recubiertas de Gonadotropina Coriónica (antígeno GC), las cuales no se aglutinan después de la incubación y centrifugación puesto que el anticuerpo ha sido neutralizado por el antígeno presente en la orina. Por lo tanto, las partículas permanecen en suspensión, causando un enturbiamiento del medio y la reacción se lee como *positiva*.

Cuando se usa la orina de una mujer *no* embarazada, los anticuerpos Anti-GC del suero no son neutralizados, ya que dicha orina normalmente no contiene GC. Estos anticuerpos permanecen libres para aglutinar las partículas de látex. En este caso las partículas aglutinadas se coleccionan en el fondo del tubo después de la incubación y centrifugación. El sobrenadante permanece claro, lo cual indica una reacción *negativa*.

Técnica.

1) Se colocaron 0,5 ml. del antisue-ro* (Anti-GC) en un tubo de ensayo de plástico o de vidrio (tubo de Kahn).

2) Se agregaron 0,5 ml. del sobrenadante de la orina centrifugada y se mezcló bien.

3) Se incubó en baño de maría a 37°C por una hora.

4) Se agregó 1 ml. del antígeno GC* bien agitado y se mezcló.

5) Se incubó en baño de maría a 37°C. durante 2 horas.

6) Se centrifugó por 2 minutos a 3.000 r.p.m.

Interpretación.

1) Se comparó el sobrenadante con un Patrón de Turbidez* bien agitado, contra un fondo negro. Si la turbidez fue mayor o igual que el patrón, se leyó como *Reacción Positiva*. Si fue menor que el patrón, se leyó como *Reacción Negativa*.

Nota.—Para esta prueba se utilizó solamente la primera muestra de la mañana, y se la usó dentro de las 12 horas siguientes, centrifugándola a alta velocidad durante 3 minutos. Se incluyeron controles adecuados, usando solución salina en lugar de orina para un control negativo, y ocasionalmente una orina positiva conocida, para un control positivo.

Correlación clínica.

Se revisaron las Historias Clínicas de todas las pacientes buscando todos los datos que permitieran afirmar, sin lugar a duda, la existencia o ausencia de embarazo. Los hallazgos clínicos considerados como diagnósticos de embarazo fueron: historia de parto, evidencia de vida fetal (movimientos, ruidos cardíacos, etc.), la demostración histológica de vellosidades coriales y la afirmación escrita en la historia (por los médicos del Servicio de Obstetricia) de que existía o había existido embarazo.

Nota.—Todos los hallazgos clínicos y de laboratorio están minuciosamente consignados en el capítulo III de la Tesis escrita sobre este mismo tema (6).

HALLAZGOS

Las tablas 1 a 4 resumen los datos observados en el curso de este estudio.

* Ortho Pharmaceutical Co., Raritan, N.J., Estados Unidos.

TABLA 1

Métodos	Nº de casos	Casos negativos	Casos positivos
R. de Galli Mainini (orina)	100	50	50
R. de Galli Mainini (suero)	100	51	49
R. Inmunológica	100	40	60

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Se ha afirmado en múltiples ocasiones que la prueba en batracios machos es más específica y produce menos reacciones falsas que los otros métodos, incluyendo el que estudiamos particularmente en este caso. Barnett (4) comparó la prueba inmunológica con la reacción descrita por Hon (7) y encontró la primera menos satisfactoria que la segunda. Si se comparan los antiguos métodos para diagnóstico biológico del embarazo con los métodos que usan batracios machos, se observa que estos últimos indudablemente ofrecen grandes ventajas tales como la sencillez de la técnica, la especificidad de la reacción, la exactitud de los resultados, la velocidad de la respuesta y la economía. Sin embargo, como se puede ver en las tablas 1 a 4, la reacción inmunológica dio un mayor porcentaje de exactitud. Además, la reacción inmunológica permitió el diagnóstico más temprano del embarazo (6), y su positividad continuó en las últimas etapas del embarazo, cuando las reacciones de Galli Mainini en orina y suero se habían negativizado. Inclusive en los casos de aborto se observó que la reacción inmunológica permanecía positiva cuando ya se había negativizado la reacción de Galli Mainini. Esto hace pensar que la reacción inmunológica es muy sensible a la cantidad relativamente pequeña de Gonadotropina Coriónica en la orina. Por otra parte, bien es sabido que las reacciones que muestran un alto índice de sensibilidad son generalmente menos espe-

cíficas. Sin embargo, en el caso presente ninguno de los exámenes efectuados presentó una reacción falsamente positiva (en los casos de mola hidatiforme, la reacción realmente no es falsa positiva, puesto que cumple con su función de demostrar la hormona).

El procedimiento de la reacción inmunológica es extremadamente sencillo, pero desde luego es necesario recordar algunas de las causas de error que podrían encontrarse en la técnica: una dosis excesiva de aspirina antes de la obtención de la muestra puede causar una reacción falsa positiva; en cambio, si se usa orina con densidad inferior a 1.015, se puede producir una reacción falsamente negativa. El uso de orinas que tengan más de 12 horas de emitidas, puede ocasionar resultados falsos. Desde luego, cualquier error en la técnica, tal como pipeteado inexacto, mezcla insuficiente de los reactivos, centrifugación a velocidades diferentes de las anotadas, incubación a temperaturas distintas de 37°C, falta de comparación con patrón o control negativo, etc., producen alteraciones en el resultado. También hay que anotar que en general es preferible efectuar la prueba no antes de 6 semanas de la iniciación del último período menstrual y no después de los 3 primeros meses del embarazo, por la posibilidad de que se produzcan reacciones falsamente negativas. Los productores comerciales de los reactivos hacen mucho énfasis en el uso de tubos de diámetro y tamaño constantes, y consideran imperativo evitar que los tubos presenten "rayaduras".

T A B L A 2

COMPARACION DE LAS REACCIONES INMUNOLOGICA
Y DE GALLI MAININI (EN ORINA)

	Total de casos	R. Galli + R. Galli +	R. Galli — R. Inmuno.—	% de coin- cidencia	% de discre- pancia
Nº de casos	100	50	40	90	10

T A B L A 3

COMPARACION DE LAS REACCIONES INMUNOLOGICA
Y DE GALLI MAININI (EN SUERO)

	Total de casos	R. Galli. + R. Inmuno. +	R. Galli. — R. Inmuno.—	% de coin- cidencia	% de discre- pancia
Nº de casos	100	49	40	89	11

En cuanto se refiere a la rapidez de la reacción, los dos procedimientos son comparables. Sin embargo, en múltiples ocasiones ha sido necesario leer 24 horas más tarde la orina de los batracios, cuando se ha obtenido un resultado negativo en la primera lectura. Desde el punto de vista económico no es posible comparar aún las reacciones, puesto que todavía no se han estable-

cido precios comerciales para los reactivos del procedimiento inmunológico en Colombia. La reacción de Galli Mainini es poco costosa en lo que se refiere a materiales, pero presupone el uso de un área mayor de laboratorio y de un cierto número mayor de horas de trabajo del personal en el cuidado de los animales.

T A B L A 4

ESPECIFICIDAD DE LAS REACCIONES

M é t o d o s	Nº de casos	Positivos	Evolución a embarazo	Especificidad
R. de Galli (orina)	100	50	73	68,49%
R. de Galli (suelo)	100	49	73	67,12%
R. Inmunológica	100	60	73	82,19%

Consideramos que una de las ventajas más significativas del método inmunológico es el hecho de que no utiliza animales. Bien es sabido por todos los que se dedican a la Patología Clínica el problema que constituye la obtención (sujeta a los caprichos de los proveedores y del clima), mantenimiento y "standarización" de los animales de laboratorio, y muy específicamente de los batracios. Las respuestas individuales de los animales y los cambios en el ambiente hacen muy difícil reproducir satisfactoriamente las reacciones. Los reactivos de la prueba inmunológica, en cambio, son estables mientras se les mantenga a la temperatura adecuada ($5^{\circ}\text{C}.$) y su fecha de expiración es larga.

Por lo tanto, se considera que la prueba (cualitativa) inmunológica para el embarazo, que se ha delineado en

el presente trabajo, es superior a la prueba (cualitativa) de Galli Mainini en suero o en orina para el diagnóstico del embarazo.

Se hace notar desde luego que las reacciones que utilizan batracios siguen siendo el método de escogencia para la determinación *cuantitativa* de Gonadotropina Coriónica en suero o en orina (diagnóstico de mola hidatiforme, corioadenoma destruens y coriocarcinoma femenino o masculino).

Los autores expresan su agradecimiento al personal del Laboratorio Clínico del Hospital Militar-Centro Médico y del Instituto Materno Infantil, por su colaboración valiosa. Especialmente a la señora Cecilia de Striegel y a la señorita Paulina Rodríguez de la Sección de Microbiología de la Institución primero mencionada.

RESUMEN

A fin de comparar la utilidad de dos métodos diferentes para el diagnóstico del embarazo, se estudian 100 mujeres (73 embarazadas y 27 no embarazadas). En cada una de ellas se lleva a cabo una reacción inmunológica cualitativa (en orina) de tipo aglutinación-inhibición y dos reacciones biológicas, con batracios machos, cualitativas (en orina y suero respectivamente). Los resultados se comparan con la evolución ulterior de las mujeres. Se encuentra que la reacción inmunológica es más sensible y más específica (como prueba cualitativa) que la reacción biológica (Galli Mainini) en suero o en orina. Se hace notar que la reacción inmunológica es más sencilla y no está sujeta a los problemas de mantenimiento y variaciones biológicas de los animales.

Nota adicional.—Después de la redacción de este trabajo los autores fueron informados de una modificación de este método, la cual se lleva a cabo en láminas y no en tubo. Esta

SUMMARY

One-hundred women were studied in order to compare the usefulness of 2 different methods of diagnosing pregnancy (73 were pregnant and 27 were not pregnant).

Each woman had a reaction to qualitative immunology (in urine) showing an agglutination inhibition type. Also, 2 biological reactions and qualitatives were had with male batrachia (in urine and serum respectively).

The results are compared with the ulterior evolution of women. It was noted that the reaction to immunology is easier and more specific (as the qualitatives prove) than a biological reaction (Galli Mainini) in serum or in urine. Notation is made that the immunological reaction is more simple and is not subject to the problems of maintenance and biological variations of animals.

modificación parece ser aún más satisfactoria (hasta 97% de correlación con la evolución de las pacientes) (8).

BIBLIOGRAFIA

(1) HENRY, J. B. et al. "Immunologic test for pregnancy" J.A.M.A. 182:230, 1962.

(2) GOLDIN, M.—"The use of latex particles sensitized with human chorionic gonadotropin in a serologic test for pregnancy". Am. J. Clin. Path. 38: 335. Sept. 1962.

(3) Ortho Research Foundation, Seminar Report N° 568-Pl. Raritan, New Jersey, Estados Unidos.

(4) BARNETT, R.—"Comparison of an immunologic and a toad test for pregnancy". Tech. Bull. Registry of Med. Technologists (Am. J. Clin. Path.) 33:54. Marzo 1963.

(5) LEÓN, J.—"Tratado de Obstetricia", pp. 643-654. Ed. Científica Argentina. Buenos Aires, 1956.

(6) SÁNCHEZ, A. S.—"Diagnóstico del embarazo por medio de la determinación inmunológica de gonadotropina coriónica". Tesis de Grado, Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá. Sept. 1963.

(7) HON, E.—"A system of pregnancy testing using male toads and frogs". E. H. Hon (Yale University), 1955.

(8) "Laboratory Notes" Jackson Memorial Hosp., Miami, Fla. 1:1. Mayo 1963.